

《総説》Cryptosporidium parvumの生存性・感染性 評価法

著者	鈴木 千枝, 中井 裕, スズ キ, ナカ イ, Suzuki C., Nakai Y.
雑誌名	複合生態フィールド教育研究センター報告 = Bulletin of Integrated Field Science Center
号	22
ページ	19-24
発行年	2006-12
URL	http://hdl.handle.net/10097/40918

《総説》 *Cryptosporidium parvum* の生存性・感染性評価法

鈴木 千枝・中井 裕

Evaluation of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum*

C. Suzuki, Y. Nakai

キーワード : *Cryptosporidium parvum*, 不活性, 生存性, 感染性, 評価法

1. はじめに

クリプトスポリジウムは、アピコンプレックス門、胞子虫綱、コキシジウム亜綱、コキシジウム目、アイメリア亜目、クリプトスポリジウム科に属する原虫である。多くの種の動物に感染が認められ、哺乳類ではおもに消化管に、鳥類では主としてファブリキウス嚢、盲・結腸、排泄腔に寄生するものが知られている。Tyzzer により、1907 年にラット由来の *Cryptosporidium muris*、1912 年にマウス由来の *C. parvum* が記載されたが、それ以降注目されることはなかった。しかし、1993 年にアメリカのミルウォーキーで 40 万人以上が感染し、114 人が死亡する集団発生例が報告され、大きな関心を集めるようになった。日本では 1994 年に神奈川で 461 人が、1996 年に埼玉県越生町で 9,000 人（町人口の 6 割以上に相当）が下痢や腹痛を訴える集団発生が起こった。これらの原因は、水道水へのクリプトスポリジウム原虫の混入であった。クリプトスポリジウム原虫は、水道水の殺菌過程で使用される塩素に強い耐性を持ち、殺滅されずに水道水を経由して大規模な集団感染を引き起こす。とくに *C. parvum* は免疫不全のヒト、および免疫抑制剤を使用しているヒトでは激しい下痢、腹痛を引き起こし、これが原因で死に至る場合も少なくない。

クリプトスポリジウムは図 1 に示すような生活環を営ん

でおり、宿主内でのみ増殖する。特効薬はなく、対症療法以外に効果的予防法・治療法がないことから、宿主体外の生活段階であるオーシストを殺滅して感染源を断つ必要がある。したがって、クリプトスポリジウムの殺滅方法の確立が早急な課題となっている。

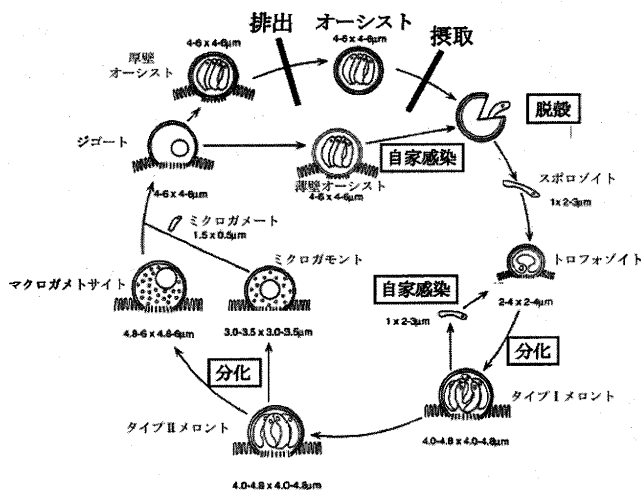
しかし、殺滅方法の効果を正確に把握するための評価手法は、十分に確立されたとは言えない。これまでもクリプトスポリジウムの不活化と評価結果 [1]、もしくは評価法同士 [2] の関連を検証した論文が多数発表されている。その中には生存性のみ焦点を当てているものも多い [3]。しかし殺滅効果の検証や、オーシストの水系汚染状況モニタリングにおいて、その感染性の有無も重要な項目である。そこで本稿では、*C. parvum* オーシストの生存性・感染性評価法についてまとめることとした。

2. 脱殻法

クリプトスポリジウムは宿主感染の際に、オーシスト壁から細胞感染段階であるスポロゾイトを放出する。これは宿主体内では、消化管内の pH や温度、胆汁酸などの刺激を受けて起こる。クリプトスポリジウムは種ごとに高い感染部位特異性を持つため、それぞれの感染部位に近づいたときに脱殻するような機構が発達していると考えられる。

1984 年には、Fayer らによって脱殻効率に関する因子についての研究が行われた [4]。その性質を利用した方法が、人工脱殻法である。生きているオーシストは周辺環境からの刺激により脱殻するため、脱殻したオーシストを“生きている”と考え、クリプトスポリジウムの生存性を評価するものである。脱殻法は脱囊法とも呼ばれる。一般的な、脱殻法を図 2 に示す。

脱殻法はクリプトスポリジウムを至適条件下に置き、その脱殻率を計数する手法なので、簡便で、特殊な設備を必要としない。そのため、つぎに示す染色法と並んで一般的に広く用いられている評価法である。しかし、実際は至適条件下に置いた生存オーシストは、100% 脱殻するとは言えない。また、Morita らは紫外線照射によって、感染に関する遺伝子のみダメージを受けたオーシストは“生きているが感染しない”という状態になることを明らかにして



参照 : Slika et al. Appl Environ Microbiol., (1997) 3669-75

図1 クリプトスポリジウム生活環

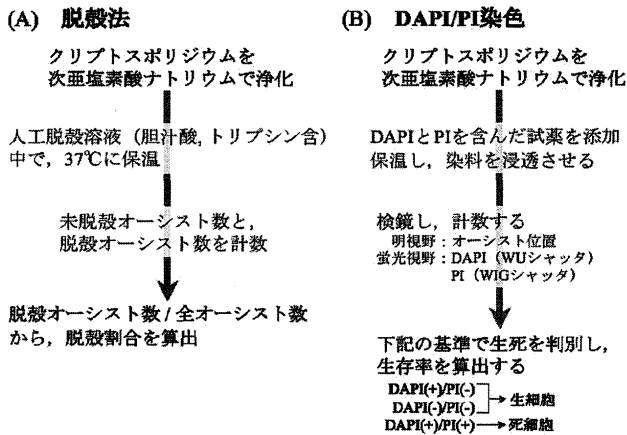


図 2 生存性評価法

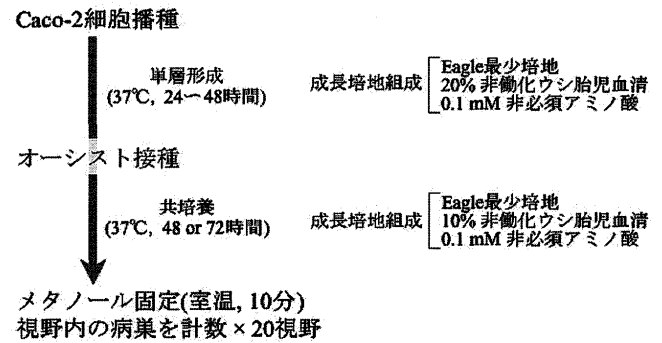


図 3 培養細胞感染法

いる [5]。このように遺伝子に損傷を与えるタイプの殺滅法を評価する場合は, その殺滅法の効果を過小評価している可能性を, 認識しておく必要がある。

Black らは化学薬剤の *C. parvum* の不活化効果を, 脱殻法, 生体染色法 (DAPI/PI 染色), およびマウス感染法を用いて, 多角的に評価した [6]。その結果, マウス感染法と比較して脱殻法と生体染色法はオーシスト生存性を過大評価しており, 化学薬剤の不活化効果を評価するには感染性を重視するべきだとまとめている。

3. 染色法

クリプトスポリジウムの染色検出には, (1) 明視野染色 (例えば, ギムザ染色やグラム染色), (2) ネガティブ染色, (3) 蛍光染色, そして (4) 免疫蛍光染色といった手法がある。この中でもっとも一般的に用いられているのは (3) に属する DAPI/PI 染色である。4', 6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) は, DNA の A:T 塩基対に特異的に結合し, 青い蛍光を発する。また, propidium iodide (PI) は死細胞のみを染色し, 赤い蛍光を発する。これら 2 つの染料に対する染色性の違いから, オーシストの生存性が見分けられる方法とされている。しかし, 実際は染料の浸透等の理由から, 誤差が大きく, 正確な評価系とは言い難い。これらの蛍光物質の浸透が容易な細胞膜を有する一般の細胞などでは, DAPI/PI 染色の結果は, 生存性を比較的正確に示すことができるが, 物質透過性が低い細胞壁やオーシスト壁を有する微生物に対して用いる場合は, 注意が必要である。より良い染色結果を得るためには, 酸性に曝露することが有効であることが示されている [7]。すでにオーシストが物理的, もしくは化学的ダメージを受けている場合は, 酸処理によって染色性が向上しないこともあり, 両色素に染まらないオーシストが存在することにより, 生存率を正確に求めることはできなくなる。ただ, 非常に簡便で, 時間がかからない手法であるため, 水処理分野を始めとして広く用いられている。

その他の染色方法は, ほとんどがクリプトスポリジウム

オーシストの有無を確認するためのものであり, 生存性は判別できない。クリプトスポリジウムの顕微鏡観察に習熟することにより, 無染色では色素による遮蔽がないため, 内部構造を見分けることができ, これによってオーシストを他の夾雑物などと鑑別することが可能である。ただし同程度のサイズをもつ, 酵母などとの鑑別にはより熟練が必要となる。

4. 培養細胞感染法

培養細胞感染法は, シャーレやフラスコ表面に培養細胞単層を形成させ, そこにオーシストまたはスポロゾイトを接種し, その感染性を評価する方法である (図 3)。

感染性を保持しているオーシストやスポロゾイトは, 細胞内に侵入し, シゾンなどの増殖段階を形成する。この細胞内に侵入したクリプトスポリジウムの増殖段階の数を計数することで, オーシストの感染性を評価することができる。*C. parvum* の感染性評価には, 株化細胞であるヒト回盲結腸アデノカルシノーマ HCT-8 細胞や, ヒト結腸アデノカルシノーマ Caco-2 細胞がおもに用いられる。いずれも, *C. parvum* の感染部位である小腸由来の培養細胞である。これらの細胞は培養・継代可能であり, ほぼ常に安定した一定の性状の培養細胞系として用いることができる。

この手法の利点は, クリプトスポリジウムの侵入や発育状況が詳細に観察できること, 細胞の前処理等の実験操作が行いやすいこと, そして実験条件を細かく設定できることである。そのため, 薬剤のスクリーニングにも用いられることが多い。この手法は生存性分析と動物感染試験との中間で, 橋渡しをする役目を果たしているのである。しかし, これらの細胞への感染性は, ヒトを始めとした哺乳類への感染性と必ずしも一致しない。Rochelle らは 5 つの genotype 2 *C. parvum* 分離株の感染性を, 4 つの細胞系列を利用した培養細胞感染法と, CD-1 マウス感染法を用いて評価し, その比較を行った。その結果, 未処理オーシスト, オゾン曝露オーシスト, そして UV 曝露オーシストにおいて, CD-1 マウス感染法と HCT-8 細胞感染法で良い相関が

得られた。しかし高いバラツキも示したため、大きな差異を判別する程度に留めるべきだとしていた。

近年はこの培養細胞感染法から発展して、様々な評価方法が確立されている。

培養細胞内のクリプトスポリジウム数は、これまで、顕微鏡観察によっていたが、定量 PCR 法が導入されている。これはサンプル中の DNA、相補的 DNA または RNA の総量を間接的に測る方法である。通常は標的遺伝子配列の存在の有無、コピー数を確認する目的で利用される。クリプトスポリジウムを接種し、感染させた培養細胞からそのまま DNA もしくは RNA 抽出を行い、リアルタイムに増幅をモニタリングするための試薬を添加して、通常の PCR とほぼ同じ操作を行う。DNA を鋳型とすれば、その標的遺伝子の存在の有無が、RNA を鋳型とすれば、その標的遺伝子の発現量が観察できる。

また一方で、培養細胞感染法と MPN 法を組み合わせ、元サンプル中の感染性オーシスト数を算出する手法もある。これは Slifko らが 1999 年に提唱したもので、Focus Detection Method – Most Probable Number (FDM-MPN) 法と呼ばれている。MPN 法とは、サンプルを段階希釈していき、どの希釈倍率で対象微生物が検出されなくなるかを求め、そのような結果になるのが最も確実性が高い元サンプル量を推定する手法である。これはサンプル中の細菌数を求めるのに、使われてきた方法である。クリプトスポリジウムの計数に応用する場合は、段階希釈したオーシスト懸濁液をそれぞれ培養細胞に接種し、病巣の有無から希釈液中のオーシストの有無を判定する。通常の培養細胞感染法では、オーシストを感染させた培養細胞単層をランダムに検鏡し、視野中の病巣数を計数することによって感染性オーシスト数を算出する。それに比べると、FDM-MPN 法の方が正確なオーシスト数を求めることができる。

染色法と培養細胞感染法を組み合わせた手法もある。これは、蛍光標識した抗体でクリプトスポリジウムをラベルし、細胞に感染させ、細胞に侵入したクリプトスポリジウムが発する蛍光を、フローサイトメトリーを用いて計数する。これはクリプトスポリジウムを感染させた後の工程が簡便なのが特徴であり、多量のサンプルの測定も短時間で可能である。この方法には、病原体解析に使用可能なフローサイトメーターが必要となる。

いずれの場合にも細胞を培養するための特殊な技術、設備が不可欠であり、細胞培養法は設備が整った研究室における解析方法である。

5. 遺伝子を利用した評価法

クリプトスポリジウムの遺伝子発現を調べることによって、オーシストの感染性を明らかにする方法が開発されている。生存性評価新規法としての Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) 法である (図 4) [10, 11]。

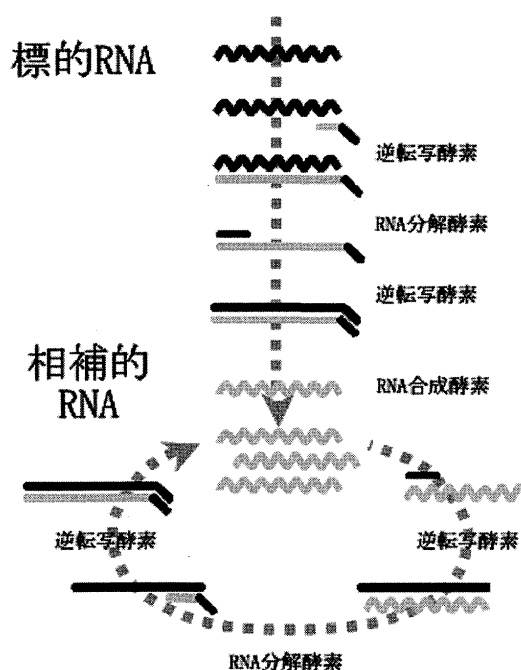


図 4 NASBA 増幅機構

これは、RNA 特異的な定温核酸増幅法で、3 種の酵素と 2 種プライマーの共同作用により、標的 RNA に相補的な一本鎖アンチセンス RNA が増幅産物として得、これを定量するものである。

RNA は DNA より分解しやすいため、その取り扱いには十分な注意が必要であるが、その過程で要する設備は一定温度に加温するためのヒートブロックのみであるため、安価である。より一般的に使用できるように、*C. parvum* をターゲットとした NASBA 検出キットの開発が進められている。このキットにおいては、*C. parvum* の熱ショックタンパク質をターゲットとして選択している。したがって、*C. parvum* を一定温度で温めて、生存オーシストが産生する mRNA を抽出し、それを NASBA 増幅、比色検出を行うことで、サンプル中の生存オーシスト数を 0.5 ～ 50 個という精度で検出することができる。他の手法と比較して、もっとも少数のオーシストの生存性を捉えられることができる。また、これらすべての作業は 1 ～ 2 日程度で終わることができるため、他の手法よりも迅速に結果を得ることができる。上水系にクリプトスポリジウムが検出された場合、その生存性・感染性は早急に確認しなければならない。クリプトスポリジウムと他の夾雑物との鑑別が正確にでき、さらに生存性も判定できることから、今後キットの普及と共に、一般的になっていく可能性がある。なお、現在開発されている方法では、*C. parvum* と *C. muris* の鑑別も可能である。

6. マウス感染法

マウス感染法は、現在の生存性・感染性評価法のうち、ヒトや他の哺乳類の感染モデルとして最も重要なゴール

ド・スタンダードであり、オーシスト感染性評価においてもっとも確かな結果を出すことができる。しかし、動物福祉的な観点や、実験用マウスが安価ではないこと、そして感染実験設備が必要で、判定期間も長期に及ぶという問題点があることから、マウス感染法の結果と良い相関を持つ代替法の模索が、長い間行われている。その結果として、これまで示してきたような様々な手法が開発され、利用されてきた経緯がある。しかし、まだマウス感染法と同様の結果を、より簡単に、正確に得られるような手法は確立されていない。

オーシストの感染性を正確に把握するため、培養細胞感染法で用いた MPN 法をマウスに応用している報告もある [5]。これはマウス 1 頭を試験管 1 本のように見立て、感染の成立・不成立から感染性オーシスト濃度を算出する。当然、使用するマウスの頭数は多く、1 サンプルの測定に数十頭が必要となるため、1 実験に数百頭を用いている。

動物福祉の観点からも、使用するマウスの頭数を減らすような実験方法を開発する必要がある。Hikosaka らは、少ない頭数で有効なデータを得るために、マウスが感染性オーシストを経口接種してから、糞中に新しいオーシストを排出し始めるまでの期間（プレパレント・ピリオド）に着目した [12]。接種した感染性オーシスト数が増えるほど、生活環を経て産生されるオーシストの量も増え、糞便からのオーシスト検出法（ショ糖浮遊法）の検出限界を超えてくるまでの期間も短縮される。このことから、接種後のプレパレント・ピリオドを観察することで、接種したサンプル中の感染性オーシスト数を推測することができる。これはマウスの個体差や、検出頻度の揺らぎをはらんでいるため細かい個数の判定には不向きであるが、log レベルの感染性変化は評価できると考えられている。また、オーシストを接種したマウスを殺すことなく評価を行えるため、これらのマウスを他の実験に再利用することも可能である。

今後は動物福祉を鑑みながら、マウス感染法と他の評価法との相関を示すデータを集め、マウス感染法と強い相関を持った代替法を開発することが重要である。感染実験設備など特殊な施設を持たないところでも、感染性に関する正確なデータが得られる方法が望ましい。

7. 評価法同士の比較

これまでに紹介してきた様々な手法は、どれも一長一短である。それぞれの実験目的に合わせた選択をしていく必要があることは言うまでもない。しかし、各々の評価法同士の評価結果を比較することで、その相関の度合いを推測することも重要である。

このデータを蓄積していくことにより、選択した評価法の精度および信頼度を認識した上で、生存性と感染性の関係を推量できるようになるだろう。これまでにも、Bukhari らのように手法比較を行った論文が多数発表されている [2]。

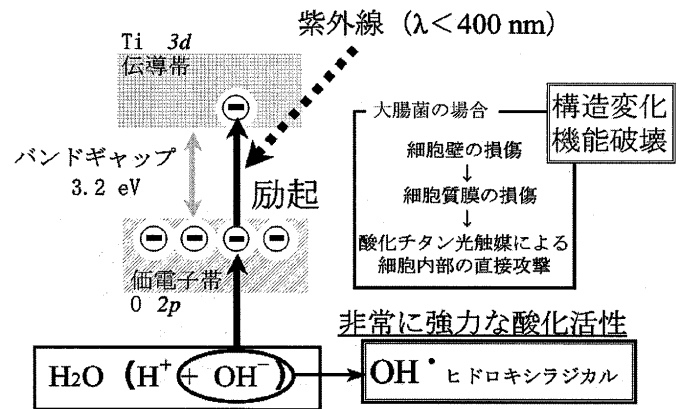


図 5 光触媒反応概略図

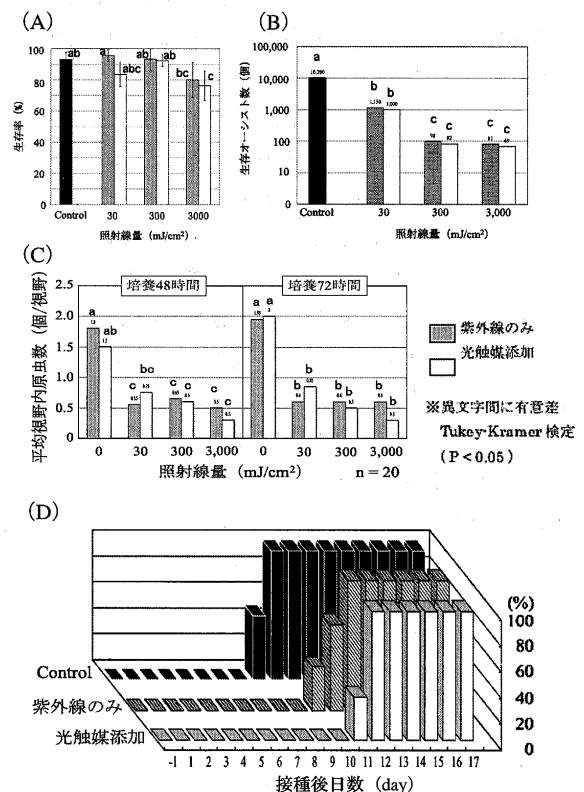


図 6 様々な評価方法による光触媒反応不活化評価

- (A) DAPI/PI 染色
(B) Competitive NASBA 法
(C) 培養細胞感染法 (Caco-2 細胞)
(D) マウス感染法
(5 週齢, ♀ SCID マウスに *C. parvum* 経口接種)

ここでは、クリプトスポリジウムの新規殺滅法として最近注目されている、光触媒反応のオーシスト殺滅効果を、DAPI/PI 染色、培養細胞感染法、Competitive NASBA 法、そしてマウス感染法を用いて、多角的に評価したわれわれの実験結果を示す。

光触媒反応は、近年、多数の分野で注目されている微生物殺滅方法である。光触媒は図 5 に示すような反応経路で、強力な酸化活性を持つヒドロキシラジカルを産生する。このヒドロキシラジカルによって、周囲の有機化学物質を酸

化し、最終的には二酸化炭素と水まで酸化分解する。その作用により得られる発現特性には、防汚性、防曇性、空気浄化、防カビ性、防菌性などがある。その中の防菌性というのは、微生物体そのものを酸化分解し、殺菌するという機能による。したがって光触媒反応で殺菌された微生物は紫外線殺菌とは異なり、光回復・暗回復で遺伝子損傷が回復することがない。この光触媒反応は大腸菌やウイルスに対する有効性は認められているものの、クリプトスポリジウムに対してどの程度効果があるのかはいまだに示されていない。

今回の実験には、光触媒作用を持つ酸化チタンを繊維に練り込み、水流に対する耐性を付与することに成功した光触媒繊維を用いた。この光触媒繊維を紫外線によって励起させて、反応体ヒドロキシラジカルを産生させた。これをクリプトスポリジウムオーシストと接触させ、その不活化割合を評価した。それぞれの手法による実験結果を図6に示す。

これらの結果から、クリプトスポリジウムが大腸菌に比べて生存性低下割合が低く、不活化効果を受けにくいことがわかった。大腸菌では光触媒を加え、 300 mJ/cm^2 の照射線量に曝露することで十分に $7 \log_{10}$ 以上の生存性低下が得られるのに対して、*C. parvum* の場合は $1 \log_{10}$ 程度の低下しか得られなかった。しかし、これが何に起因するものかはいまだ不明である。

生存性も照射線量に伴って有意に減少するが、感染性はより顕著に紫外線、光触媒反応の影響を受けることがわかった。生存性を確認する評価法では90%程度の不活化までしか得られなかった一方で、感染性を確認する評価法では90～99%程度の不活化が得られた。これは \log レベルで表すと $1 \log_{10}$ と $2 \log_{10}$ の差となる。それぞれの評価法のズレとも考えられるが、おそらく既に報告されているように生きているが脱殻しない、もしくは感染性を持たないものが存在していると考えられる。

紫外線照射、光触媒反応によって \log レベルの生存性・感染性低下は起こるものの、感染は成立することには注意しなければならない。不活化効率が上がっても、感染が成立するとその動物またはヒトが新たな感染源となり、大規模な集団感染へと繋がる可能性がある。確実な不活化、出来れば微生物体そのものを破壊するような形のシステムが確立できれば、大規模な水系伝播は大幅に低減されるだろう。光触媒はヒドロキシラジカルによる微生物体破壊をもたらす反応系であり、今後の条件検討により、原虫完全殺滅システムとして確立していくことが望ましい。

また、表1にそれぞれの実験結果を比較し、特長をまとめた。光触媒を加え、 $3,000 \text{ mJ/cm}^2$ の紫外線に曝露したサンプルでの不活化評価結果を比較した。DAPI/PI染色は簡便であるが、不活化率15%と非常に低い結果を示した。先に述べた通り、これはDAPIとPIの染色性に問題があるの

表1 光触媒を添加し $3,000 \text{ mJ/cm}^2$ の紫外線に曝露した場合の不活化評価結果の比較

	不活化率	特長
マウス感染法	99	ヒト・動物感染モデル
DAPI/PI染色	15	簡便
培養細胞感染法	90	詳細な観察が可能
Competitive NASBA法	99	高感度、キット化

かもしれない。Competitive NASBA法は、これまで感染実験法や形態観察、染色法に頼った評価方法と異なり、遺伝子をターゲットとして生存性を評価するという点において画期的である。そしてPCR法よりも、オーシストの生死、そのシステムでの不活化能力の検討に適している。培養細胞感染法はマウス感染法の結果に近く、かつ細かいサンプリングや区分けによって詳細な観察やスクリーニングに利用することができる。細胞の培養、継代を的確に行えば、安価な評価法となる。しかし細胞培養やオーシストの前処理は煩雑で、手軽にできないという欠点もある。マウス感染法は、オーシストの殺滅評価においてもっとも的確な結果を出すことができるが、特殊な実験設備が必要で、判定期間も長期に及ぶという問題点もある。また、SCIDマウスも安価ではないため、多量のサンプルに用いることはできない。これらの考察から、Competitive NASBA法と培養細胞感染法は、今後、マウス感染法に変わりうる手法であると考えられる。

クリプトスポリジウムの殺滅効果評価方法は、マウス感染法を基準として、各試験法の感度や正確さを明確に算定する必要があり、特徴を理解した上での実験の実施が期待される。さらに多角的評価を行い、各種の評価法の感度や精度を明確にする必要がある。今後、データ収集を進めていくことで、マウス感染法を行うことができない研究室でも、NASBA法などの代替手法により、不活化評価試験が行えるようになると考えられる。

8. 引用文献

- 1) Weir SC, Pokorny NJ, Carreno RA, Trevors JT, Lee H. (2002) Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cell Culture, Appl Environ Microbiol., 68(5), 2576-9.
- 2) Bukhari Z, Marshall MM, Korich DG, Fricker CR, Smith HV, Rosen J, Clancy JL. (2000) Comparison of *Cryptosporidium parvum* Viability and Infectivity Assays following Ozone Treatment of Oocysts, Appl Environ Microbiol., 66(7), 2972-2980.
- 3) Curtis TP, Walker G, Dowling BM, Christensen PA. (2002) Fate of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in an immobilised titanium dioxide reactor with electric field enhancement, Water Res., 36(9), 2410-3.

- 4) Fayer R, Leek RG. (1984) The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*., J Protozool., 31 (4), 567-9.
- 5) Morita S, Namikoshi A, Hirata T, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S, Motoyama N, Fujiwara M. (2002) Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts., Appl Environ Microbiol., 68 (11), 5387-93.
- 6) Black EK, Finch GR, Taghi-Kilani R, Belosevic M. (1996) Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection., FEMS Microbiol Lett., 135 (2-3), 187-9.
- 7) Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV. (1992) Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes., Appl Environ Microbiol., 58 (11), 3488-93.
- 8) Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korich DG, Rosen JS, De Leon R. (2002) Comparison of In Vitro Cell Culture and a Mouse Assay for Measuring Infectivity of *Cryptosporidium parvum*, Appl Environ Microbiol., 68 (8), 3809-17.
- 9) Slifko TR, Huffman DE, Rose JB. (1999) A most-probable-number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts., Appl Environ Microbiol., 65 (9), 3936-41.
- 10) Baeumner AJ, Humiston MC, Montagna RA, Durst RA. (2001) Detection of viable oocysts of *Cryptosporidium parvum* following nucleic acid sequence based amplification., Anal Chem., 73 (6), 1176-80.
- 11) Lowery CJ, Moore JE, Thompson HP, Dooley JSG. (2003) Detection of Viable Oocysts of *Cryptosporidium parvum* by Nucleic Acid Sequence Based Amplification, *Cryptosporidium : From Molecules to Disease*, 265-6.
- 12) Hikosaka K, Satoh M, Koyama Y, Nakai Y. (2005) Quantification of the infectivity of *Cryptosporidium parvum* by monitoring the oocyst discharge from SCID mice., Vet Parasitol., 134 (1-2), 173-6.